

**A humán ABCG2 multidrog transzporter fehérje kölcsönhatása  
molekulárisan célzott daganatellenes gyógyszerekkel**

Doktori értekezés tézisei

**Hegedüs Csilla**

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar  
Biológia Doktori Iskola  
Immunológia Program

Témavezetők:

Prof. Sarkadi Balázs

Dr. Laczka Csilla

A Biológia Doktori Iskola vezetője:

Prof. Erdei Anna

Az Immunológia Program vezetője:

Prof. Erdei Anna



Magyar Tudományos Akadémia Membránbiológiai Kutatócsoport

Budapest

2013

## BEVEZETÉS

A humán ABCG2 transzporter az ABC (ATP Binding Cassette) fehérjecsaládba tartozó plazmamembrán glikoprotein. Az ABCG2 fehérje két szerkezetileg és funkcionálisan elkülönülő doménből, az N-terminálison elhelyezkedő, az ATP megkötéséért és hidrolíziséért felelős citoplazmatikus nukleotidkötő doménből (nucleotide binding domain, NBD) valamint a C-terminálison lévő, a transzportált szubsztátok felismeréséért és megkötéséért felelős hat membránba ágyazott hélixből álló transzmembrán doménből (transmembrane domain, TMD) épül fel. Az ABCG2 homodimerként működve xenobiotikumok és intracellulárisan képződő metabolitok membránon át történő szállításában vesz részt, ATP hidrolíziséből származó kémiai energia terhére. Az ABCG2 elsősorban a plazmamembránban, polarizált sejtekben az apikális plazmamembrán kompartmentben helyezkedik el. Fiziológias körülmények között magas szintű expressziót mutat a méhlepény szinciciotrofoblaszt sejteiben, a vékony- és a vastagbél epithél sejteiben, a máj kanalikuláris membránjában, a vese proximális tubulusaiban, a tüdő alveoláris pneumocytá sejteiben, emlőszövetben, valamint a vénák és kapillárisok endothéliumában. Fiziológias szöveti eloszlása alapján az ABCG2 feltehetően a felnőtt szervezet és a magzat idegen anyagokkal szembeni védelmében játszik fontos szerepet. Az ABCG2 őssejtekben is kifejeződik, ahol funkciója a differenciálatlan állapot fenntartásáért és/vagy az őssejtek mérgekkel, stressz-faktorokkal szembeni illetve oxigénhiányos körülmények közötti védelméért felelős. Az ABCG2 fokozott kifejeződését különféle szöveti eredetű tumorsejteken is megfigyelték. Az ABCG2 védő funkciója ellenállóvá teszi a daganatsejteket számos eltérő kémiai szerkezetű és hatásmechanizmusú gyógyszerrel szemben, kialakítva a daganat multidrog rezisztencia (MDR) fenotípusát. A legújabb eredmények szerint az ABCG2 funkciója alapján definiálható, jellemzően őssejtekben gazdag ún. side populáció (SP) tumorszövetekből is izolálható. A daganatokból származó side populáció sejtek számos közös vonást mutatnak a normál őssejtekkel, így képesek önmegújításra, és rezisztensek számos kémiai ágenssel szemben. Ezek alapján feltételezhető, hogy az ABCG2 kulcsszerepet játszhat bizonyos "daganat őssejtek" gyógyszer rezisztenciájának kialakításában, közvetve pedig a daganat-kiújulás folyamatában is.

Ismert, hogy számos tumor kialakulásának hátterében protein kináz enzimek szabályozatlan működése áll, ezért a klinikumban számos kis molekulású kináz inhibitor vegyületet alkalmaznak a kinázfüggő rosszindulatú sejtek célzott elpusztítására. A Bcr-Abl fehérje konstitutív tirozin kináz aktivitása a krónikus mieloid leukémia (CML), míg az Epidermális Növekedési Faktor Receptor (EGFR) szabályozatlan tirozin kináz aktivitása számos szolid tumor kialakításában játszik kulcsszerepet. A multispecifikus ABCG2 transzporter számos protein kináz gátlószerrel is kölcsönhatásba lép, és a szöveti barrieréken valamint a tumorsejteken expresszáldva egyaránt módosíthatja a daganatellenes vegyületek farmakokinetikai tulajdonságait, valamint a célsejtre kifejtett antitumor hatását. Munkánkban biokémiai módszerek segítségével részletesen jellemeztük az ABCG2 kölcsönhatását a Bcr-Abl illetve az EGFR kináz enzimek klinikumban is alkalmazott kis molekulású gátlószereivel.

## **CÉLKITŰZÉSEK**

A dolgozatomban részletesen bemutatott első projekt kezdetén az ABCG2 és az elsőként kifejlesztett és alkalmazott Bcr-Abl inhibitor vegyület, az imatinib kölcsönhatásáról ellentmondásos irodalmi adatok álltak rendelkezésre, míg a transzporter kölcsönhatása második generációs Bcr-Abl gátlószerekkel egyáltalán nem volt ismert. Célul tűztük ki tehát:

- annak vizsgálatát, hogy az imatinib képes-e befolyásolni a humán ABCG2 fehérje ATPáz aktivitását,
- humán ABCG2 fehérjét stabilan kifejező Bcr-Abl<sup>+</sup> K562 sejttes modellrendszer előállítását és jellemzését,
- annak tisztázását, hogy a humán ABCG2 fehérje befolyásolja-e az imatinib sejten belüli hatását,
- az imatinibbel validált Sf9 membrán- és Bcr-Abl<sup>+</sup> K562 sejt-alapú modellrendszerek használatával összehasonlító biokémiai jellemzést adni a humán ABCG2 és a második generációs Bcr-Abl inhibitor nilotinib, dasatinib és bosutinib kölcsönhatásáról.

A dolgozatomban ismertetett második projektben az ABCG2 fehérjével kölcsönható EGFR gátlószer gefitinib kontrollként történő használatával célul tűztük ki:

- humán ABCG2 fehérjét kifejező Sf9 rovarsejt membrán preparátumok alkalmazásával az ABCG2 és a második generációs EGFR inhibitor vandetanib, pelitinib és neratinib lehetséges kölcsönhatásának tesztelését,
- annak vizsgálatát, hogy az ABCG2 módosítja-e a vandetanib, pelitinib és a neratinib intracelluláris hatását humán ABCG2 fehérjét stabilan kifejező EGFR+ A431 sejtekben,
- annak elemzését, hogy a vandetanib, pelitinib és a neratinib képes-e gátolni a humán ABCG2 fehérje működését,
- annak tanulmányozását, hogy a gefitinib kezelés befolyásolja-e az ABCG2 fehérje expresszióját,
- annak felderítését, hogy a PI3-kináz/Akt jelpálya szerepet játszik-e a humán ABCG2 fehérje lokalizációjának gyors szabályozásában.

## VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

A kis molekulású Bcr-Abl illetve EGFR kináz inhibitor vegyületeket a VICHEM Chemie Kutató Kft. bocsátotta rendelkezésünkre. A munka során használt humán vad típusú ABCG2 fehérjét stabilan overexpresszáló sejtvonalak retrovírus- illetve transzpozon-alapú génbeviteli eljárással készültek Dr. Német Katalin és Dr. Orbán Tamás laboratóriumában. A sejtvonalak totál ABCG2 fehérje expresszióját az anti-ABCG2 BXP-21 nevű ellenanyag használatával ellenőriztük, Western blot segítségével. Az ABCG2 sejtfelszíni megjelenését a fehérje extracelluláris epitópját felismerő 5D3 jelű antitesttel történő immunfestéssel követtük áramlási citometriás mérésekben. Az ABCG2 funkcióját az ABCG2 szubsztrát Hoechst 33342 intracelluláris akkumulációjának real-time fluorimetriás méréseivel ellenőriztük. Az ABCG2 funkciójának gátlásához a specifikus inhibitor Fumitremorgin C-t (FTC) vagy annak analógját a Ko143 jelű vegyületet használtuk.

A humán vad típusú ABCG2 fehérjét Baculovírus heterológ expressziós rendszerben termeltettük *Spodoptera frugiperda* (Sf9) rovarsejtekben. A rovarsejteket 72 órán át inkubáltuk rekombináns baculovírustal, majd a fertőzött és ABCG2 fehérjét termelő Sf9

sejtekből koleszterin-töltést követően ultracentrifugálással membrán frakciót preparáltunk. A rovarsejt-membránok rekombináns ABCG2 fehérje-hozamát Western blottal ellenőriztük, anti-ABCG2 BXP-21 immunfestéssel. Az ABCG2 fehérjét kifejező Sf9 membránokon vizsgáltuk a kis molekulású kináz inhibitorok vanadát-szenzitív ABCG2 ATPáz aktivitására kifejtett hatását az ATP hidrolízisét követően felszabaduló inorganikus foszfát mennyiségének kolorimetriás detektálásával.

A kináz gátlók citotoxikus hatását parentális illetve ABCG2 transzportert kifejező sejtekben TOPRO-3 festést követő áramlási citometriás mérésben illetve MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium) festést követő spektrofotometriás mérésben határoztuk meg. A vizsgált vegyületek célzott illetve downstream kinázokra kifejtett hatását az enzimek foszforilációs állapotának vizsgálatával követtük foszfo-specifikus ellenanyagok és Western blot technika alkalmazásával. A Bcr-Abl inhibitor imatinib esetében a vegyület által indukált eritroid differenciációs folyamatot is összehasonlítottuk parentális és ABCG2 fehérjét expresszáló K562 sejtekben, az élő sejtek hemoglobin tartalmának benzidin festéssel történő meghatározásával. A Bcr-Abl inhibitorok ABCG2-közvetített sejten belüli akkumulációját nagynyomású folyadékkromatográfia-tömegspektrometria (high pressure liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS) mérésekben vizsgáltuk, Dr. Takáts Zoltán laboratóriumával együttműködésben.

A vizsgált kináz gátlók hatásait az ABCG2 fehérje konformációjára a transzporter extracelluláris epitópját felismerő konformáció-szenzitív 5D3 ellenanyag segítségével követtük áramlási citometriás mérésekben. Az 5D3 antitestet magas affinitással kötő ABCG2 fehérje konformáció előidézéséhez a fehérje specifikus inhibitorát a Ko143 vegyületet alkalmaztuk referenciaként. A vegyületek ABCG2 funkciójára kifejtett gátló hatásait ABCG2-közvetített Hoechst 33342 valamint mitoxantron transzport spektrofotometriás illetve áramlási citometriás mérésével vizsgáltuk.

Az ABCG2 plazmamembrán lokalizációját és szubcelluláris eloszlását anti-ABCG2 5D3 antitesttel jelölt sejtekben valamint GFP-ABCG2 fehérjét kifejező sejtekben vizsgáltuk áramlási citometria illetve konfokális mikroszkóp alkalmazásával.

## EREDMÉNYEK

- Létrehoztuk és jellemeztük a humán ABCG2 fehérjét stabilan kifejező K562 sejtvonalat.
- A krónikus mieloid leukémia eredetű K562 sejtek Bcr-Abl pozitivitásuk miatt érzékenyek a Bcr-Abl kináz farmakológiai gátlására, ezáltal a Bcr-Abl gátló imatinib sejten belüli toxikus hatását összehasonlíthattuk a parentális illetve az ABCG2 fehérjét kifejező K562 sejtekben. Igazoltuk, hogy az ABCG2 funkciója ellenállóvá teszi a K562 sejteket az imatinib sejtpusztító hatásával szemben. A K562/ABCG2 sejtek imatinib rezisztenciája a fehérje specifikus inhibitorával, a Ko143-mal visszafordítható volt. Bemutattuk továbbá, hogy K562 sejtekben az ABCG2 megakadályozza az imatinib-indukált eritroid differenciációs folyamatot is. Eredményeinkkel azokat az irodalmi adatokat támasztottuk alá, melyek szerint az imatinib az ABCG2 fehérje transzportált szubsztrátja.
- A Bcr-Abl+ K562 modellsejtek alkalmazásával kimutattuk, hogy az ABCG2 csökkenti a második generációs Bcr-Abl inhibitor nilotinib és dasatinib sejtpusztító hatását is, míg funkciója nem befolyásolja a bosutinib citotoxicitását.
- A Bcr-Abl kináz foszforilációs státuszának követésével bizonyítottuk, hogy K562/ABCG2 sejtekben az imatinib, a nilotinib és a dasatinib a transzporter specifikus funkciójának következtében nem képes eljutni az intracelluláris célfehérjéhez és gátolni annak autofoszforilációját.
- HPLC-MS detekciós alapú direkt transzport mérésekkel igazoltuk, hogy a bosutinibbal ellentétben a nilotinib és a dasatinib az ABCG2 transzportált szubsztrátja.
- Bemutattuk, hogy EGFR+ A431 sejtekben az ABCG2 gefitinib és pelitinib rezisztenciát okoz, míg a vandetanib és a neratinib toxikus hatásától nem képes megvédeni meg a sejteket.
- Igazoltuk, hogy a rezisztencia hátterében A431/ABCG2 sejtekben a gefitinib és pelitinib jelenlétében is kimutatható fokozott EGFR foszforiláció áll.

- Magasabb koncentrációkban az összes vizsgált kináz inhibitor vegyület gátolta az ABCG2 fehérje funkcióját, elősegítve az ABCG2 szubsztrát Hoechst 33342 és mitoxantron akkumulációját.
- Bemutattuk, hogy gefitinib kezelés hatására megnő az ABCG2 kifejeződése a sejtfelszínen, ugyanakkor az EGFR/PI3K/Akt/mTOR jelpálya gátlása nem vezet a fehérje gyors internalizációjához.
- Munkánk során igazoltuk, hogy a PI3-kináz gátló LY294002 és az mTOR kináz gátló rapamycin gátolja az ABCG2 fehérje működését is.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az összes vizsgált kis molekulású kináz inhibitor vegyület kölcsönhatásba lép az ABCG2 multidrog transzporterrel. Alacsony lokális gyógyszer koncentrációk mellett az ABCG2 működése imatinib, nilotinib, dasatinib, gefitinib és pelitinib rezisztenciát okoz, ezzel szemben az ABCG2 jelenléte nem befolyásolja az alacsony dózísú bosutinib, neratinib és vandetanib hatékonyságát. Magas koncentrációban alkalmazva az összes vizsgált kináz gátlószer képes blokkolni az ABCG2 fehérje működését, elősegítve a kombinációban alkalmazott ABCG2 szubsztrát daganatellenes vegyületek sejten belüli akkumulációját. Ezen jelenségek szignifikánsan módosíthatják a vizsgált Bcr-Abl illetve EGFR kináz gátló gyógyszerek *in vivo* hatékonyságát is az ABCG2 fehérjét is kifejező kinázfüggő rosszindulatú daganatsejtek és daganat összejtek elpusztítására irányuló célzott terápiák során. Eredményeink ezért hasznosak lehetnek a vegyületek terápiás alkalmazhatóságának felmérésében, valamint az ABCG2 fehérje gátlásán keresztül hatékonyabbnak ígérkező kombinációs kezelések kidolgozásában is.

## A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

**Hegedüs C**, Özvegy-Laczka C, Apáti A, Magócsi M, Német K, Órfi L, Kéri G, Katona M, Takáts Z, Váradi A, Szakács G, Sarkadi B. Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties. *Br J Pharmacol*. 2009 Oct;158(4):1153-64.

**Hegedüs C\***, Truta-Feles K\*, Antalffy G, Brózik A, Kasza I, Német K, Orbán TI, Özvegy-Laczka C, Váradi A, Sarkadi B. PI3-kinase and mTOR inhibitors differently modulate the function of the ABCG2 multidrug transporter. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Apr 20;420(4):869-74. (\* megosztott első szerző)

**Hegedüs C\***, Truta-Feles K\*, Antalffy G, Várady G, Német K, Özvegy-Laczka C, Kéri G, Órfi L, Szakács G, Settleman J, Váradi A, Sarkadi B. Interaction of the EGFR inhibitors gefitinib, vandetanib, pelitinib and neratinib with the ABCG2 multidrug transporter: Implications for the emergence and reversal of cancer drug resistance. *Biochem Pharmacol*. 2012 Aug 1;84(3):260-7. (\* megosztott első szerző)

**Hegedüs C**, Özvegy-Laczka C, Szakács G, Sarkadi B. Interaction of ABC multidrug transporters with anticancer protein kinase inhibitors: substrates and/or inhibitors? *Curr Cancer Drug Targets*. 2009 May;9(3):252-72.

Brózik A, **Hegedüs C**, Erdei Z, Hegedüs T, Özvegy-Laczka C, Szakács G, Sarkadi B. Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ATP binding cassette multidrug transporters: substrates, chemosensitizers or inducers of acquired multidrug resistance? *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2011 May;7(5):623-42.



## EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

Brózik A, Casey NP, **Hegedüs C**, Bors A, Kozma A, Andrikovics H, Geiszt M, Németh K, Magócsi M. Reduction of Bcr-Abl function leads to erythroid differentiation of K562 cells via downregulation of ERK. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Dec;1090:344-54.

Özvegy-Laczka C, Laczkó R, **Hegedüs C**, Litman T, Várady G, Goda K, Hegedüs T, Dokholyan NV, Sorrentino BP, Váradi A, Sarkadi B. Interaction with the 5D3 monoclonal antibody is regulated by intramolecular rearrangements but not by covalent dimer formation of the human ABCG2 multidrug transporter. *J Biol Chem.* 2008 Sep 19;283(38):26059-70.

**Hegedüs C**, Szakács G, Homolya L, Orbán TI, Telbisz A, Jani M, Sarkadi B. Ins and outs of the ABCG2 multidrug transporter: an update on in vitro functional assays. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Jan 31;61(1):47-56.

Telbisz A, **Hegedüs C**, Özvegy-Laczka C, Goda K, Várady G, Takáts Z, Szabó E, Sorrentino BP, Váradi A, Sarkadi B. Antibody binding shift assay for rapid screening of drug interactions with the human ABCG2 multidrug transporter. *Eur J Pharm Sci.* 2012 Jan 23;45(1-2):101-9.